Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

BETA–GLUCURONIDASE– UND HYALURONIDASEAKTIVITÄT IM SERUM BEI MORBUS CROHN UND COLITIS ULCEROSA

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

ROSWITHA STÖCKELER

aus Haslach

1979

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

BETA–GLUCURONIDASE– UND HYALURONIDASEAKTIVITÄT IM SERUM BEI MORBUS CROHN UND COLITIS ULCEROSA

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

ROSWITHA STÖCKELER

aus Haslach

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. Dr. N. Schwenzer
Berichterstatter:	Professor Dr. J. Durst (Professor Dr. L. Koslowski) Professor Dr. W. Heller

gedruckt bei Fa. H. J. Köhler , Reprografischer Betrieb . 74 Tübingen , Neue Str. 11

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
B	ALLGEMEINER TEIL	2
	I ß-Glucuronidase	2
	II Hyaluronidase	3
	III Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	5
	1. Ätiologie und Pathogenese	5
	a. Infektion mit Bakterien oder Viren	5
	b. Fremdallergene	6
	c. Zirkulierende Antikörper	6
	d. Zytotoxizität der Lymphozyten	6
	2. Systemmanifestationen und Komplikationen	7
	3. Lokalisation, makroskopische Befunde und Histologie	8
	4. Differentialdiagnosen	10
C	SPEZIELLER TEIL	13
	I Material	13
	1. Material zur Bestimmung der ß-Glucuronidase	13
	2. Material zur Bestimmung der Hyaluronidase	13
	3. Verwendete Laborgeräte	15
	II Methoden	16
	1. ß-Glucuronidasebestimmung	16
	a. Erstellung einer Eichkurve	16
	b. Versuchsanordnung	18
	2. Hyaluronidasebestimmung	18
	III Auswertung der Versuchsergebnisse	20
	1. Berechnung des ß-Glucuronidasegehaltes	20
	2. Berechnung des Hyaluronidasegehaltes	21
	3. Statistik	21

Seite

IV Definition des „Aktivitätsindex" 23

V Erläuterungen zu Patienten und Probanden 24

D ERGEBNISSE 26

I ß-Glucuronidase 26

1. Vergleich der Meßergebnisse von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie Probanden 26

2. Vergleich der Meßergebnisse der Crohn-Patienten nach Ausdehnung der Erkrankung und nach erfolgter Operation 28

3. Vergleich der Meßergebnisse der Crohn-Patienten nach dem Aktivitätsindex 28

II Hyaluronidase 31

1. Aufschlüsselung des Patienten- und Probandenkollektives 31

2. Vergleich der Meßergebnisse zwischen Crohn-Patienten und Probanden 32

3. Vergleich der Meßergebnisse der Crohn-Patienten nach Ausdehnung der Erkrankung und nach erfolgter Operation 32

4. Vergleich der Meßergebnisse des Crohn-Kollektives nach dem Aktivitätsindex 33

E ZUSAMMENFASSUNG 37

F LITERATURVERZEICHNIS 39

A EINLEITUNG

Im Jahre 1932 beschrieben Crohn, Ginzburg und Oppenheimer (7) unter dem Titel „Regional ileitis. A pathologic and clinical entity" 14 Fälle mit entzündlichem Befall des terminalen Ileums. Doch schon früher waren wiederholt stenosierende granulomatös entzündliche Darmveränderungen beschrieben worden, ohne daß sie als einheitliches Krankheitsbild erkannt worden waren (2,37). Der Terminus „Ileitis regionalis" bzw. „Ileitis terminalis", geprägt von den Erstbeschreibern wegen der damals überwiegenden Lokalisation im Dünndarm, mußte im Laufe der Erforschung dieses Krankheitsbildes geändert werden. Durch die Erkenntnis, daß der ganze Verdauungskanal von der Mundhöhle bis zum Enddarm als Ort der Erkrankung in Frage kommen kann (66), werden heute unter anderem folgende Synonyma verwendet: „Enteritis regionalis", „Enterocolitis regionalis Crohn", „Colitis granulomatosa" und „Morbus Crohn".
Ebenso ätiologisch unbekannt wie der Morbus Crohn, und in engem differentialdiagnostischem Zusammenhang mit diesem zu sehen, ist die Colitis ulcerosa.
Seit der Erstbeschreibung dieser beiden Krankheitsbilder wird, neben der Suche nach der Ätiologie und den jeweiligen spezifisch pathognomonischen Symptomen, auch versucht eine diagnostisch verwertbare laborchemische Methode zu finden.
Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch die quantitative photometrische Bestimmung der Enzymkonzentrationen von ß-Glucuronidase und Hyaluronidase im Serum von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu klären, ob diese beiden Fermente signifikante Veränderungen in den Patientenkollektiven gegenüber einer Kontrollgruppe aufweisen.

B ALLGEMEINER TEIL

I ß-Glucuronidase

Die ß-Glucuronidase ist ein im menschlichen Organismus sowie im Säugetierorganismus ubiquitär nachweisbares Enzym (10), das erstmals 1915 von Sera in tierischem Gewebe nachgewiesen wurde (55).
Hinsichtlich der biologischen Funktion der ß-Glucuronidase darf als gesichert gelten, daß dieses Enzym neben einem hydrolytischen Effekt auf Glucuronide auch Transferase-Eigenschaften im Rahmen der Glucuronidierung besitzt, wodurch der Glucuronsäurerest von einem Aglykon auf ein anderes übertragen werden kann. Durch diesen Wirkungsmechanismus besitzt der Organismus ein die Glucuronidierung quantitativ und wahrscheinlich auch qualitativ regulierendes System (10).
Klinisches Interesse gewinnt die ß-Glucuronidase durch ihre Beziehung zu den Sexualhormonen, diese bewirken eine echte Enzymsynthese der ß-Glucuronidase. Dabei ist bemerkenswert, daß die Androgene einen selektiven Anstieg der Nieren-ß-Glucuronidase bewirken (23). Die Beziehung der Östrogene, die in engem Zusammenhang mit dem physiologischen Rhythmus im weiblichen Organismus stehen, und der ß-Glucuronidase zeigt sich u. a. im Anstieg der Serum-ß-Glucuronidaseaktivität im Verlauf des Menstruationscyclus, wobei das Maximum ungefähr in der Mitte des Cyclus liegt. Auch im Verlauf der Schwangerschaft steigt die Serum-ß-Glucuronidase kontinuierlich an (11,52).
Nach Untersuchungen von Fishman et al. (22) hat sich ergeben, daß in carcinomatös entartetem Gewebe die Aktivität der ß-Glucuronidase höher ist als in normalem Gewebe.
Erhöhte ß-Glucuronidasewerte im Serum zeigten sich auch

bei Lebererkrankungen (50) und Diabetes mellitus (41). Bei der Arteriosklerose ist ein Zusammenhang mit dem Enzym umstritten. Kayahan (34) weist auf eine Beziehung zwischen Arteriosklerose und ß-Glucuronidase hin, während Hagenfeldt und Wahlberg (27) keine Beziehungen nachweisen konnten. Auch bei Erkrankungen der tieferen Darmabschnitte, wie akute oder chronische Enteritiden, war nach Dohrmann (9) immer eine erhöhte ß-Glucuronidaseaktivität im Serum nachweisbar.
Diese Aufzählung zeigt, daß der ß-Glucuronidaseaktivität kein organ- oder krankheitsspezifischer Wert beigemessen werden kann, was auch in Anbetracht des Vorkommens dieses Fermentes in allen Organen kaum zu erwarten war. Es wäre jedoch denkbar, daß die ß-Glucuronidaseaktivität bei Morbus Crohn und bei Colitis ulcerosa von funktionsdiagnostischer Bedeutung sein kann. Offenbar sind die Enzymaktivitäten bei solchen Erkrankungen erhöht, bei denen die „Entgiftungsfunktion" des Organismus nicht mehr den Anforderungen gewachsen ist.

II Hyaluronidase

Das Enzym Hyaluronidase wurde zuerst aus Mikroorganismen isoliert (40), später auch aus Säugetier-Testes (38). Dabei zeigte sich, daß je nach Herkunft verschiedene Hyaluronidasen unterschieden werden müssen, die sich durch ihre unterschiedliche Substratspezifität auszeichnen (53).
Im Entzündungsablauf des Organismus spielt die Hyaluronidase, die unter anderem von zahlreichen Bakterien gebildet wird, eine wesentliche Rolle. Sie verursacht den Abbau des Reusensystems der Mucopolysaccharide im Gewebe, was zu einer erhöhten Durchlässigkeit von Haut und Binde-

gewebe für Fremdsubstanzen führt (53).
Diese diffusionsfördernden und permeabilitätssteigernden Eigenschaften der Hyaluronidase lassen sich zur Beschleunigung und Erleichterung der Zufuhr von Medikamenten praktisch ausnutzen (25).
Nach Untersuchungen von Platt (52) steigt während der Gravidität, neben der ß-Glucuronidase, auch die Hyaluronidase im Serum kontinuierlich an.
Weitere klinische Anwendung findet die Hyaluronidase beim Myxödem, denn örtliche, oft wiederholte Hyaluronidaseinjektionen wurden mit Erfolg beim prätibialen Myxödem angewandt (35). Doch auch Hämatome und andere Ergüsse können durch Verwendung von Hyaluronidase zur schnellen Resorption gebracht werden. Dies ist ein typisches Beispiel für die Beschleunigung bzw. Verbesserung des „inneren Kreislaufs" (25).
Im Gegensatz zu dieser positiven Hyaluronidaseanwendung steht die klinisch negative Auswirkung der verminderten Gewebebarriere. Hier besteht die Möglichkeit, daß Bakterien mittels ihrer Hyaluronidasen die Mucopolysaccharidsäuren der Bindegewebe verändern und dadurch den Keimen den Weg in den Wirtsorganismus öffnen bzw. die Ausbreitung der durch sie produzierten Toxine erleichtern. Wie weit das Invasionsvermögen, die Pathogenität und Virulenz von Bakterien und ihre Hyaluronidasebildung einander parallel gehen können, ist kaum allgemein gültig zu beantworten (25).
Das Verhalten mancher Bakterien läßt jedoch die Vermutung zu, daß bei erhöhter Bakterienzahl im Organismus möglicherweise auch mit erhöhten Hyaluronidasewerten zu rechnen ist.

III Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

1. Ätiologie und Pathogenese

Bisher ist unbekannt, welche ätiologischen und pathogenetischen Faktoren dem Morbus Crohn (19,26,33,54,63) und der Colitis ulcerosa (30,37,65) zugrunde liegen. Verschieden Mechanismen werden diskutiert:

a. Infektion mit Bakterien oder Viren (21,31,65)

Mitchell et al. (44) konnte bei Crohn-Kranken eine ähnliche Zahl positiver Kveim-Tests nachweisen wie bei Sarkoidose-Patienten. Diese Feststellung führte zu der Annahme, daß eine enge Beziehung zwischen dem Morbus Crohn und der Sarkoidose besteht (45). Die Tatsache, daß Siltzbach et al. (60) die Befunde nicht bestätigen konnte, wird von Karlish et al. (32) mit Unterschieden im verwendeten Testmaterial erklärt. Inzwischen ist jedoch die Unspezifität des Kveim-Tests nachgewiesen worden, dessen positiver Ausfall bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit Beteiligung des lymphatischen Systems vorkommt (29).
Nachdem es 1969 gelungen war, die Sarkoidose auf die Pfoten normaler und immundefizitärer Mäuse zu übertragen (42), gelang Mitchell und Rees (43) das gleiche auch mit ultrafiltrierten Extrakten aus Lymphknoten von Crohn-Kranken. 1973 konnten Cave et al. (5) die menschliche Crohnsche Erkrankung mit Gewebsextrakten auf Kaninchen übertragen.
Im gleichen Jahr gelang auch bei der bisher negativen Erregersuche der Colitis ulcerosa ein positives Ergebnis. Farmer et al. (21) fanden bei einigen Fällen einen gegenüber Kontrollen signifikant erhöhten Antikörpertiter gegen Zytomegalieviren. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unklar.

b. Fremdallergene

Die Bedeutung von Antikörpern gegen Nahrungsbestandteile, besonders das Vorkommen von Milchantikörpern bei Colitis ulcerosa, ist sehr umstritten (12). Im Tierversuch war es gelungen allergische Entzündungen des Dünndarms hervorzurufen, die dem Morbus Crohn des Menschen ähnlich sind (16,17,61). Auch der Colitis ulcerosa ähnliche Veränderungen im Dickdarm konnten experimentell durch Sensibilisierung mit einem Allergen nachgewiesen werden (3).

c. Zirkulierende Immunkomplexe

Von Jewell (30) und Doe et al. (8) wurde über das Vorkommen von zirkulierenden Immunkomplexen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa berichtet. Ihre Nachweisbarkeit und Menge scheinen aber kein Gradmesser für die Aktivität und Schwere der Erkrankung zu sein.

d. Zytotoxizität der Lymphozyten

Nach Perlmann und Broberger (51) sind Lymphozyten von Patienten mit Colitis ulcerosa in der Lage, fetale Colonepithelien spezifisch zu schädigen. Diese Zytotoxizität der Lymphozyten von Colitis- und Crohn-Kranken wurde von Shorter et al. (57,58,59) eingehend untersucht. Es zeigte sich dabei, daß der zytotoxische Effekt der Lymphozyten durch Colektomie und durch Antithymozytenserum aufgehoben und durch Inkubation der zytotoxischen Lymphozyten mit dem Colikeim O119:B14 vermindert werden kann. Außerdem blieb die Zytotoxizität der

Lymphozyten auf die Epithelien des Colons beschränkt, während die zellfreien Extrakte auch die Epithelien des Ileums, des Jejunums, des Magens und der Leber lysierten. Die letzte Reaktion wurde dem Lymphotoxin zugeschrieben.
Somit scheinen sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa gegen die normale Darmflora gerichtete immunologische Reaktionen eine Rolle zu spielen. Shorter et al. (56) entwickelte daraus die Hypothese, daß beide Erkrankungen durch eine lokale Hypersensibilität gegen Antigene aus normalen Darmbakterien hervorgerufen werden kann.

2. Systemmanifestationen und Komplikationen

Die Begleitkrankheiten der Enteritis regionalis sind überwiegend dieselben wie die der Colitis ulcerosa. Es handelt sich dabei um das Erythema nodosum, Pyoderma gangränosum, die Monarthritis oder Polyarthritis, Spondylarthritis ankylopoetica, um okuläre Symptome und um manifeste Lebererkrankungen (18,63,65).
Beim Morbus Crohn kommen als weitere mögliche Kennzeichen die Trommelschlegelfinger und die vom erkrankten Darm ausgehenden Fisteln und Abszesse hinzu (33,63).
Die Colitis ulcerosa weist als zusätzliche Komplikationen eine Anämie, Elektrolytverluste sowie Gerinnungsstörungen auf. Letztere sowohl in Form von verminderter Gerinnungsfähigkeit mit thrombozytopenischer Purpura als auch in thromboembolischen Erkrankungen, wie tiefe Beinvenenthrombose oder Lungenembolie (15,65).

3. Lokalisation, makroskopische Befunde und Histologie

Nach Farmer et al. (20) ist die Crohnsche Erkrankung zu 41 % im terminalen Ileum und dem rechten Colon lokalisiert, in 28,6 % kommt es zu einem alleinigen Befall des Dünndarms und in 27 % zu einem isolierten Colonbefall. Die restlichen 3,4 % zeigen eine anorektale Manifestation ohne andere anfänglich sichtbare Beteiligung.
Da der Morbus Crohn in allen Teilen des Gastrointestinaltraktes vorkommen kann (66), wurden sowohl eine geschwürige Stomatitis (4,13) als auch eine Miterkrankung des Ösophagus (39,62) und des Magens (1,14) gefunden.
Der makroskopische Befund des Darmlumens bei der Colitis granulomatosa zeigt eine dicke weiße, ausgesprochen transmurale Fibrose. Das Mesenterium ist ödematös geschwollen und zeigt abnorm große Lymphknoten mit Lymphadenitis und Lymphangitis sowie starke mesenteriale Fettinfiltration mit Übergreifen auf die ödematös hyperämische Darmwand. Die Abgrenzung zwischen den segmentären Läsionen und den gesunden Teilen ist relativ scharf. Die Mukosa kann in der terminalen Ileumschlinge, aber auch im Colon, während einer ziemlich langen Evolutionsperiode ein grobhöckeriges Aussehen zeigen, wobei die Spalten und Fissuren zwischen Inseln noch bestehender, aber stark ödematisierter Mukosa und Submukosa tief in die Darmwand eindringen. Diese Veränderungen verursachen das „pflastersteinartige" Relief im Röntgenbild (37,63).
Nach histologischen Untersuchungen von Morson (46) finden sich in 75 % der Fälle entzündliche Granulome in der Darmwand. Sie bestehen aus einem mononukleären lymphoblasmozytären Entzündungsinfiltrat und Follikeln, die aus Epitheloidzellen sowie Riesenzellen aufgebaut sind. Es kommt aber zu keiner zentralen Verkäsung der Granulome.

Dieselben sarkoiden Läsionen wie sie in der Darmwand gefunden werden, können auch häufig in den regionären Lymphknoten nachgewiesen werden. Neben diesem zuverlässigsten diagnostischen Kennzeichen, dem Granulom, gibt es noch andere Anhaltspunkte für die Diagnose Morbus Crohn: Fissuren, Wandverdickungen, Lymphangiektasien, lymphoide Hyperplasie und pylorusähnliche Metaplasie.
Im Gegensatz zur Enteritis regionalis, bei deren segmentärer Ausbreitung das Rectum häufig unbeteiligt bleibt, ist der bevorzugte Sitz der Veränderungen bei der Colitis ulcerosa im Enddarm mit kontinuierlicher Ausbreitung nach kranial (37).
Auch bei der Colitis ulcerosa kann es zu einer Mitbeteiligung der Mundhöhle (48), des Ösophagus (6) und des terminalen Ileums (37) kommen.
Makroskopisch ist das von der Colitis ulcerosa befallene Colon von einer intakt erscheinenden, hyperämischen Serosa bedeckt. Die regionalen Lymphknoten sind meist vergrößert (47). Das Colon ist infolge muskulärer Verdickungen und Spasmen verkürzt und zusammengezogen. In schweren Fällen kommt es zur Dilatation und Verdünnung der Colonwand, die brüchig wird und leicht perforiert. Die Mukosa wird ödematös, blutet leicht, hat ein granuliertes samtartiges Aussehen und ist bei Berührung brüchig. Manchmal finden sich oberflächliche Ulzerationen, während tiefergehende Ulzera weniger häufig und dann linear angeordnet sind. Überschießendes Wachstum der Mukosa von den Ulcusrändern her läßt polypenartige Veränderungen entstehen, wobei Brückenbildungen im Rectum gewöhnlich weniger ausgeprägt sind. Segmentale Strikturen können durch muskuläre Verdickungen, Spasmen oder neoplastische Veränderungen zustande kommen (47).
Das mikroskopische Bild der Colitis ulcerosa entspricht einer allergisch-hyperergischen Reaktion mit Vaskularisierung, Ödemen, eosinophilen Infiltrationen und den

Zeichen eines fortdauernden Spasmus der umgebenden Muskulatur. Die entzündlichen Veränderungen sind auf die Mukosa beschränkt, die ödematös, hyperämisch und mit Plasmazellen, Eosinophilen und Lymphozyten infiltriert ist. Die Muscularis propria wird von der Entzündung nicht mitergriffen, ausgenommen bei fulminant verlaufenden Attacken. In schweren Fällen zeigt das Epithel Nekrosen und Sekundärinfektionen. Die Öffnungen der Lieberkühnschen Krypten werden durch Fäzes und Schleim verstopft und herdförmig von polymorphkernigen Leukozyten und Mikroorganismen umgeben, dadurch entstehen die sogenannten Kryptenabszesse. Diese Abszesse vergrößern sich, rupturieren entweder ins Lumen des Colons oder breiten sich entlang des submukösen Gewebes aus, wobei sie winzige kragenknopfförmige Abszesse oder linear angeordnete, unterminierte Ulzera entlang der Tänien bilden. Von den Rändern dieser tiefen Ulzera wächst die Mukosa zu polypenartigen Gebilden aus, die im Inneren aus Granulationsgewebe bestehen und von Epithel bedeckt sind (47).

4. Differentialdiagnosen

Da der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa bisweilen miteinander verwechselt werden, denn beide weisen eine vergleichbare Alters- und Geschlechtsverteilung wie auch einen ähnlich heimtückischen Krankheitsbeginn auf, ist die Unterscheidung zwischen diesen Erkrankungen von besonderer Bedeutung.
Bei beiden sind Diarrhoen häufig, aber die rektale Blutung ist bei der Colitis granulomatosa viel seltener. Perianaler Befall findet sich als Komplikation bei 20 % der Colitis ulcerosa-Kranken, aber bei fast 75 % der Patienten mit Crohnscher Erkrankung des Colons (65). Bei der Rektoskopie steht die diffuse Proktitis mit starken

Kontaktblutungen bei der Colitis ulcerosa im Gegensatz entweder zum normalen Rectum oder zur ausgesprochen umschriebenen Proktitis und Ulzeration des Morbus Crohn, wobei eine Kontaktblutung nur schwer zu erzeugen ist (65). Bei den weit fortgeschrittenen chronischen Formen mit schwerem Befall des Rectosigmoids ist eine rektoskopische Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa kaum möglich. Bei beiden Erkrankungen ist dann die rektale Schleimhaut über große Flächen vollkommen ulzeriert und mit schleimig-eitrigem Belag bedeckt. Ferner kommt es auch bei der Enteritis regionalis zur Bildung von Pseudopolypen aus den verbliebenen entzündeten Schleimhautinseln eines progressiv sklerosierenden und geschrumpften Rectums (63).
Die röntgenologische Untersuchung zeigt bei der Colitis ulcerosa kontinuierliche Veränderungen, die distal meist am stärksten sind, dagegen einen diskontinuierlichen Prozeß bei der Crohnschen Erkrankung, bei der das rechte Colon am stärksten befallen ist. Die feine Zähnelung, die Ulzeration und die Pseudopolyposis der Colitis ulcerosa können oft von der groben pflastersteinartigen Schleimhaut mit den typischen Spicae und den Strikturen bei der Enteritis regionalis unterschieden werden. Der Befall des Ileums ist bei der Colitis ulcerosa selten, häufig aber beim Morbus Crohn, bei dem das terminale Ileum verengt ist (65).
Beide Erkrankungen haben einen chronisch rezidivierenden Verlauf. Innere Fistelbildungen finden sich nur bei der Colitis granulomatosa, dagegen sind maligne Veränderungen bei der Colitis ulcerosa viel häufiger. Während die Colitis ulcerosa durch Proktokolektomie geheilt werden kann, kommt es beim Morbus Crohn in annähernd 50 % der Fälle innerhalb von 5 Jahren zu Rezidiven (65).
Differentialdiagnostisch kommen jedoch noch andere Krankheiten infrage:
Der Morbus Crohn muß unter anderem gegen die primär ileale

oder ileocoecale Tuberkulose bzw. gegen sekundäre Darmläsionen nach Lungentuberkulose, gegen ischämische Colitis, Divertikulose und Divertikulitis, Periarteriitis nodosa, Sklerodermie, Amyloidose, Lymphosarkom, Lymphogranulomatose und Amöbiasis abgegrenzt werden (63). Die Colitis ulcerosa kann mit infektiösen Diarrhöen, einem Carzinom des Colons und Rectums, der ischämischen Colitis, der funktionellen Diarrhoe, dem Syndrom des irritablen Colon, der radiogenen Proktitis und dem „Laxantien-Colon" verwechselt werden (65).

C SPEZIELLER TEIL

I M a t e r i a l

Für beide Aktivitätsbestimmungen wurde bei -20° C eingefrorenes Serum von männlichen und weiblichen Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa verwendet, sowie entsprechend vorbehandeltes Serum von gesunden Probanden beiderlei Geschlechts.

1. Material zur Bestimmung der ß-Glucuronidase

Alle nachfolgend aufgeführten Reagentien wurden von der Firma Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA bezogen:
Phenolphthalein Standard Solution, Stock No. 105-1
Acetate Buffer, 0,2 M, pH 4,5, 25° C, Stock No. 105-12
Phenolphthalein Glucuronic Acid, 0,03 M, pH 4,5, 25° C, Stock No. 325-2
2-Amino-2-Methyl-1-Propanol Buffer, 0,1 M, pH 11, 25° C, Stock No. 325-3

2. Material zur Bestimmung der Hyaluronidase

Von der Firma E. Merck, Darmstadt, stammten folgende Reagentien:
4-Dimethylaminobenzaldehyd, zur Analyse, Art. 3058
Essigsäure (Eisessig), min. 96 %, zur Analyse, Art. 62
Hyaluronsäure, Kaliumsalz, Art. 24817
N-Acethyl-D-glucosamin, Art. 1422
Natriumacetat krist., zur Analyse, Art. 6267
Natriumchlorid krist., zur Analyse, Art. 6404
Salzsäure, min. 32 %, zur Analyse, Art. 319

Kaliumtetraborat-4-hydrat, Art. 11620, von Riedel-De Haen AG, Seelze-Hannover

Acetat-Puffer (50 mM Acetat, pH 4,0, 0,15 M NaCl):
a) 5,78 ml Eisessig wurden mit Aqua dest. ad 1 l verdünnt (0,1 M)
b) 13,6 g Natriumacetat wurden mit Aqua dest. ad 1 l gelöst (0,1 M)
Dann wurden 41,0 ml Lösung a) zu 9,0 ml Lösung b) gegeben und der pH mit Lösung a) oder b) auf 4,0 nachgestellt. Anschließend wurden 0,875 g NaCl zugefügt und mit Aqua dest. ad 100 ml aufgefüllt.

Hyaluronat (1,25 mg/ml):
62,5 mg Hyaluronsäure wurden in 50 ml Acetat-Puffer gelöst.

N-Acetyl-D-glucosamin-Standardlösung:
10 mg N-Acetyl-D-glucosamin wurden in 10 ml Acetat-Puffer aufgelöst und 2 Standardlösungen hergestellt:
a) 0,5 ml mit Acetat-Puffer ad 25 ml (20 µg/ml) und
b) 0,5 ml mit Acetat-Puffer ad 50 ml (10 µg/ml) verdünnt.

Tetraborat (0,8 M, pH 9,1):
24,44 g Kaliumtetraborat-4-hydrat wurden mit Aqua dest. ad 100 ml gelöst und mit 5 N Kalilauge auf pH 9,1 eingestellt.

Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens:
12,5 ml 32 % Salzsäure wurden mit Eisessig ad 100 ml aufgefüllt und darin 10 g Dimethylaminobenzaldehyd gelöst.

Alle Lösungen wurden bei 4° C aufbewahrt. Die Pufferlösung war so lange haltbar, wie keine Bakterien oder Pilze darin wuchsen. Die Hyaluronat- und Acetylglucosamin-Lösungen wurden wöchentlich neu angesetzt. Die Dimethylaminobenzaldehyd-Stammlösung war einen Monat haltbar (38).

3. Verwendete Laborgeräte

Zentrifuge Modell J-21, Firma Beckman Instruments GmbH, München
Spektralphotometer PM 4, Firma Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.
Präzisionswaagen vom Typ H 16 und vom Typ M5SA der Firma Metteler-Waagen GmbH, Gießen
Digitalmeter Digi 610 von den Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten, Weilheim
Thermostat 3401, Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, GmbH, Hamburg
Thermostat FS 2, Firma Haake, Karlsruhe

II Methoden

1. ß-Glucuronidasebestimmung

Es wurde nach einer von Heller (28) abgeänderten Methode von Fishman (24) vorgegangen.

a. Erstellung einer Eichkurve

Dazu waren notwendig:
(1) Lösung A (Verdünnungsmittel für den Phenolphthalein-Standard):
3,6 ml Acetat-Puffer
2,4 ml Aqua dest.
30 ml 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol-Puffer
Diese Reagentien wurden miteinander gemischt.
(2) Arbeitslösung:
Durch Mischen von 0,5 ml Phenolphthalein-Standardlösung mit 12,5 ml der Lösung A wurde eine Lösung hergestellt, die 40 µg/ml Phenolphthalein enthielt.
(3) Verdünnungsreihe:
Aus der Arbeitslösung und der Lösung A wurde nachfolgende Verdünnungsreihe mit entsprechender Phenolphthaleinkonzentration hergestellt:

Verdünnung	Phenolphthaleinkonzentration (µg/ml)
1:5	8,0
1:8	5,0
1:10	4,0
1:16	2,5
1:20	2,0
1:25	1,6
1:40	1,0

Diese Verdünnungsreihe wurde im Spektralphotometer bei

540 nm gegen Aqua dest. abgelesen und die Ergebnisse in einer Kurve graphisch dargestellt (siehe Abb. 1).

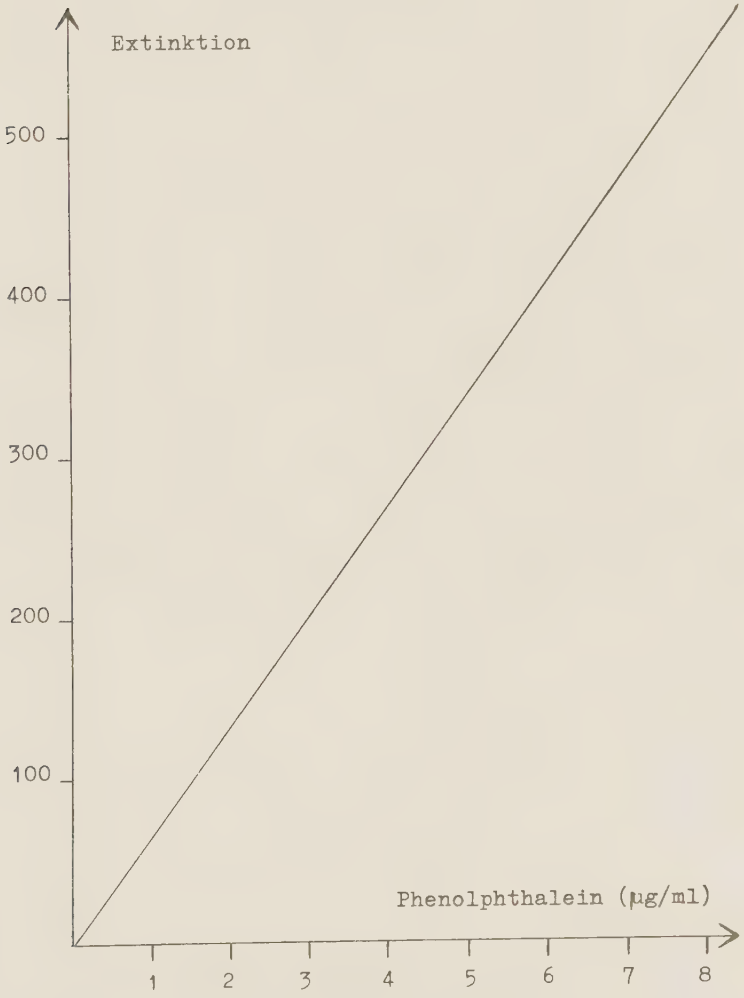

Abb. 1: Eichkurve zur Bestimmung der ß-Glucuronidase-Konzentration.

b. Versuchsanordnung

Für die Versuche wurde eingefrorenes Serum im Thermostat langsam bei 37° C aufgetaut.
Bei jedem Bestimmungsansatz lief ein Reagentienleerwert mit, der sich aus 0,6 ml Acetat-Puffer, 0,2 ml Phenolphthalein-Glucuronsäurelösung und 0,2 ml Aqua dest. zusammensetzte. Von jedem zu testenden Serum wurde ein Serumleerwert und ein Analysenwert hergestellt. In den Serumleerwert pipettierte man nacheinander 0,6 ml Acetat-Puffer und 0,2 ml Aqua dest., in die Analyse 0,6 ml Acetat-Puffer und 0,2 ml Phenolphthalein-Glucuronsäurelösung. Alle drei Werte wurden gemischt und im Wasserbad gleichmäßig auf 56° C erhitzt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurden, außer in den Reagentienleerwert, je 0,2 ml Serum zugegeben, nochmals gemischt und für eine Stunde bei 56° C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der ganze Ansatz aus dem Wasserbad herausgenommen, mit je 5,0 ml 2-Amino-2-Methyl-Propanol-Puffer durchmischt und sofort im Spektralphotometer bei 540 nm gegen Aqua dest. abgelesen.

2. Hyaluronidasebestimmung

Die Bestimmungen wurden nach Bergmeyer (38) durchgeführt.
Um eine größere Genauigkeit über die Meßergebnisse zu erhalten wurden sämtliche Untersuchungen als Doppelwerte angesetzt.
Das eingefrorene Serum wurde auch hier im Thermostat langsam bei 37° C aufgetaut und dann mit dem Acetat-Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt, dies wurde als Probe bezeichnet. Danach wurden 0,8 ml Hyaluronat-Lösung 15 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach dieser

Zeit gab man 0,2 ml Probe zu, mischte und inkubierte weitere 10 Minuten. In der Zwischenzeit wurde der Probenleerwert wie folgt angesetzt: 0,2 ml Tetraborat, 0,8 ml Hyaluronat-Lösung und 0,2 ml Probe. Anschließend pipettierte man in entsprechend beschriftete Reagensgläser:

0,6 ml des Probenleerwertes

0,1 ml Tetraborat und 0,5 ml Acetat-Puffer als Reagentienleerwert

0,1 ml Tetraborat und 0,5 ml der 10 µg/ml enthaltenden Acetylglucosamin-Lösung als Standard 10

0,1 ml Tetraborat und 0,5 ml der 20 µg/ml enthaltenden Acetylglucosamin-Lösung als Standard 20

0,1 ml Tetraborat und 0,5 ml der genau 10 Minuten inkubierten Hyaluronat-Proben-Lösung als Analyse.

Alle Reagensgläser wurden nun gut durchgemischt, für 3 Minuten in kochendes Wasser gestellt um die Reaktion zu beenden und dann unter Leitungswasser abgekühlt. Im Anschluß daran wurden je 3,0 ml Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens zugefügt, das vorher 1:10 mit Eisessig verdünnt worden war, nochmals gemischt und 20 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde erneut unter Leitungswasser abgekühlt und dann 4 Minuten bei 12000 Upm ultrazentrifugiert. Dieses Vorgehen war notwendig geworden, da eine leichte Trübung der Analyse und der Probenleerwertes gegenüber dem Reagentienleerwert auftrat. Zum Schluß wurden die Extinktionen der Lösungen bei 585 nm gegen den Reagentienleerwert gemessen.

III Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Berechnung des ß-Glucuronidasegehaltes

Die Konzentration der ß-Glucuronidase im jeweiligen Serum wurde wie folgt berechnet:

(1) $Ext._{A} - Ext._{SL} + Ext._{RL}$

Es ist:
Ext. = Extinktion
A = Analyse
SL = Serumleerwert
RL = Reagentienleerwert

Mit diesem Ergebnis wurde aus der angelegten Eichkurve (siehe Abb. 1) der µg Phenolphthaleingehalt bei entsprechendem Extinktionswert entnommen.

(2) Der aus der Eichkurve bestimmte Phenolphthaleingehalt wurde mit dem Faktor 3000 multipliziert, dies ergab den Glucuronidasegehalt in Fishman-Einheiten pro 100 ml Probe bei 56° C. Dieser Endwert gab, laut Beipackzettel zu den Sigma-Reagentien, etwa dreimal die Menge von Fishman-Einheiten an, die man bei 37° C erhalten würde.

Der Faktor 3000 entstand durch $\frac{6}{0,2} \times 100$

Es ist:
6 = Menge des Endvolumens
0,2 = Probevolumen
100 = Faktor um U/ml in U/100 ml anzugeben

2. Berechnung des Hyaluronidasegehaltes

Jede Bestimmung wurde doppelt ausgeführt und der daraus resultierende Mittelwert zur Auswertung verwendet.
Die Enzymaktivität in U/l wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{Ext._P - Ext._{PL}}{Ext._{St}} \times \frac{2}{0,2} \times \frac{F}{221,2} \times 1000$$

$$\frac{Ext._P - Ext._{PL}}{Ext._{St}} \times 45 \times F \quad \text{(U/l) bei } 37^\circ \text{ C}$$

Es ist:
Ext. = Extinktion
P = Probe
PL = Probenleerwert
St = 10-µg-Standard
0,2 = Probevolumen
221,2 = Molgewicht von N-Acetyl-D-glucosamin
F = Verdünnungsfaktor der Probe durch Vorbereitung

3. Statistik (36,64)

Um die ausgewerteten Versuchsergebnisse beider Untersuchungen zu aussagekräftigen Zahlenwerten zu machen wurde berechnet:
(1) Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Es ist:
x = Einzelwert
n = Anzahl der Einzelwerte

(2) Standardabweichung

$$s_x = \pm\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

(3) t-Test (Student-Test)

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_{\bar{x}1}^2 + s_{\bar{x}2}^2}}$$

Im Student-Test für Paardifferenzen wurde der Prüfquotient t bestimmt und die Grenze für signifikante Abweichung bei $p \leq 0{,}05$ festgelegt, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art von 5 % entspricht.

(4) Varianzanalyse

Um mehrere Stichproben miteinander zu vergleichen wurde die einfache Varianzanalyse angewandt.

IV Definition des „Aktivitäts-index"

Die Diagnose Morbus Crohn wurde aufgrund verschiedener Kriterien gestellt, welche die Klinik, Röntgenuntersuchung, Endoskopie, Chirurgie und Histologie berücksichtigen.
Die Aktivität der Erkrankung wurde nach einem Index der National Cooperative Crohn's Disease Study der USA (49) aus folgenden Parametern berechnet:

Anzahl der weichen Stühle oder Durchfälle in der letzten Woche x 2;
Grad der Bauchschmerzen (0 = keine, 1 = leicht, 2 = mäßig, 3 = stark; Summe über 1 Woche) x 5;
Allgemeinbefinden (0 = im allgemeinen gut, 1 = nicht ganz gut, 2 = schlecht, 3 = sehr schlecht, 4 = unerträglich; Summe über 1 Woche) x 7;
Andere mit Morbus Crohn assoziierte Symptome wie: Gelenkschmerzen und/oder Arthritis, Iritis und/oder Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangränosum, Stomatitis aphtosa, Analfissur/-fistel/-abszeß, andere Fisteln, Temperaturen über 37,5° C in der vergangenen Woche (Anzahl der zutreffenden Symptome) x 20;
Symptomatische Durchfallbehandlung + 30;
Resistenz im Abdomen (0 = nein, 2 = fraglich, 3 = sicher) x 10;
Hämatokrit (Frauen 42 - HKT, Männer 47 - HKT) x 6;
Gewicht

$$\left[1 - \frac{\text{Gewicht}}{\text{Standardgewicht}}\right] \times 100$$

Erkrankungen mit einem Aktivitätsindex ≤ 100 wurden als „leicht", mit einem Index zwischen 101 und 200 als „mäßig" und solche mit einem Index > 200 als „schwer" klassifiziert.

V Erläuterungen zu Patienten und Probanden

Von 97 Patienten mit Morbus Crohn im Alter von 16 - 70 Jahren (Durchschnittsalter 31,5 Jahre) und 25 Colitis ulcerosa-Kranken, deren Alter zwischen 19 und 65 Jahren (Durchschnittsalter 33,5 Jahre) lag, wurde Serum auf ß-Glucuronidase untersucht.
Zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhielten von den Crohn--Patienten 24 Salazopyrin, 2 Prednisolon, 2 beide Medikamente, 3 Azathioprin und 2 alle drei Chemotherapeutika. Zwei weitere Personen wurden mit Azathioprin und Salazopyrin behandelt. Salazopyrin kombiniert mit anderen Steroiden wurde von 15 Patienten eingenommen und 38 erhielten keine Therapie.
Die Ausdehnung der Crohnschen Erkrankung war unterschiedlich: 28 mal war nur der Dünndarm und 14 mal ausschließlich der Dickdarm beteiligt. 30 Kranke wiesen Veränderungen an Dünn- und Dickdarm auf. Bei einem Patienten zeigte sich ein Crohn des Magens. 24 Patienten waren operiert worden. Außerdem konnten bei 22 Crohn--Kranken Fisteln nachgewiesen werden.
Bei den Colitis ulcerosa-Patienten war dreimal das Colon exstirpiert worden und 6 Patienten wiesen keine Krankheitszeichen auf.
An Medikamenten erhielten 16 Salazopyrin, ein Patient Prednisolon, ein weiterer Patient beide Medikamente und 7 keine Therapie.
Das oben erwähnte Patientenkollektiv wurde zum größten Teil auch zur Hyaluronidasebestimmung herangezogen. Dies bedeutete, daß die bereits angeführten Altersangaben bei dieser Untersuchung ebenso zutrafen. Da jedoch beim Nachweis der Hyaluronidase nur 36 „positive" Werte (siehe Seite 31) erhoben werden konnten, veränderte sich das Durchschnittsalter bei den Crohn-Kranken auf 28,25 Jahre und bei den Colitis ulcerosa-Patienten auf 46,5 Jahre.

Der Medikamentenspiegel für die 36 Patienten mit „positivem" Hyaluronidasenachweis lautete für die Crohn--Kranken (27 Personen) wie folgt: 7 Salazopyrin, 2 Azathioprin und Salazopyrin, 6 Salazopyrin und andere Steroide, 1 Azathioprin, Salazopyrin und Prednisolon und 9 keine Therapie.
Zwölfmal wurden Fisteln nachgewiesen. Bei 8 Erkrankten war ausschließlich der Dünndarm befallen, bei weiteren 8 Dünn- und Dickdarm und bei 4 Crohn-Kranken kam es zum alleinigen Befall des Colon. Vier Patienten waren operiert worden.
Für die 9 „positiven" Hyaluronidasebestimmungen an Colitis ulcerosa-Patienten ergab sich, daß 5 davon mit Salazopyrin behandelt worden waren und 3 keine Therapie erhalten hatten.
Zweimal war eine Colektomie durchgeführt worden und 2 Patienten zeigten keine Krankheitszeichen.
Als Kontrollgruppe für beide Enzymbestimmungen dienten 14 gesunde Normalpersonen im Alter von 22 - 41 Jahren.

D ERGEBNISSE

I ß-Glucuronidase

1. Vergleich der Meßergebnisse von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie Probanden

Die ß-Glucuronidaseaktivität wurde bei 96 Patienten (58 Männer, 38 Frauen) mit Morbus Crohn, 25 Patienten (17 Frauen, 8 Männer) mit Colitis ulcerosa und 12 Normalpersonen (7 Männer, 5 Frauen) im Serum gemessen (siehe Abb. 2). Es ergaben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen der ß-Glucuronidase-Konzentration in Fishman-Einheiten/100 ml bei 56° C:

Probanden: $2620 \pm 637{,}47$ (n = 12)
Patienten mit Morbus Crohn: $3478{,}44 \pm 1625{,}53$ (n = 96)
Patienten mit Colitis ulc.: $3471{,}60 \pm 1507{,}15$ (n = 25)

Bei dieser Auswertung blieb ein Wert unberücksichtigt, der bei einem Crohn des Magens bestimmt wurde. Er lag mit 31 350 Fishman-Einheiten/100 ml etwa neunmal höher als der Mittelwert des Crohn-Kollektivs.

Die ß-Glucuronidasewerte der beiden Patientenkollektive wiesen im t-Test (36,64) eine statistisch signifikante Erhöhung mit $p \leq 0{,}05$ bezüglich der Probanden auf.

Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen den Crohn- und Colitis-Patienten.

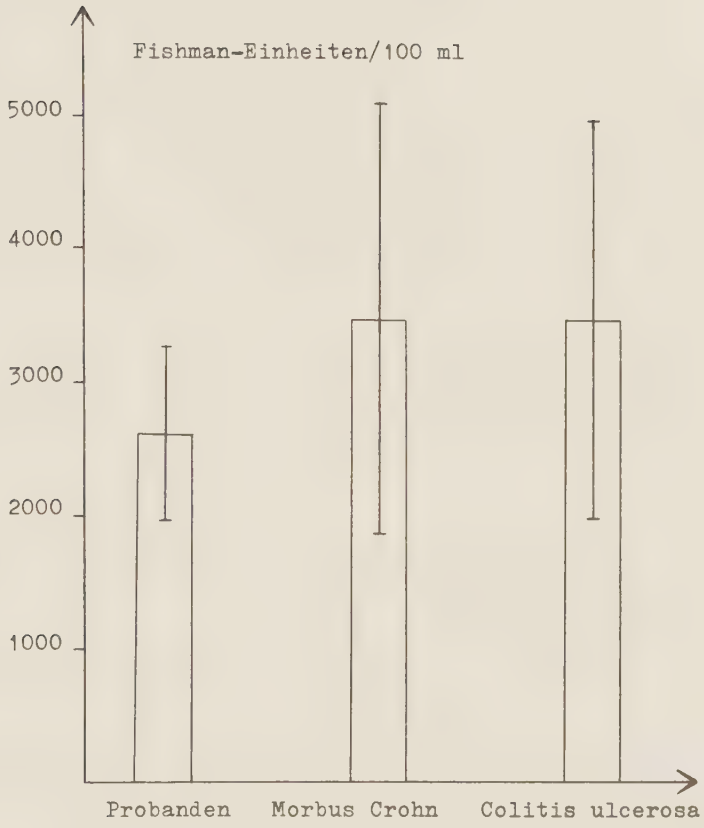

Abb. 2: Mittelwerte und Standardabweichungen des ß-Glucuronidasegehaltes bei drei verschiedenen Untersuchungsgruppen. Abszisse: Gruppeneinteilung

2. Vergleich der Meßergebnisse der Crohn-Patienten nach Ausdehnung der Erkrankung und nach erfolgter Operation

Werden die Mittelwerte und Standardabweichungen des ß-Glucuronidasegehaltes bei Patienten mit Morbus Crohn nach der Ausdehnung der Erkrankung und nach der Operation miteinander verglichen (siehe Abb. 3), so sind diese Gruppen untereinander, gemäß der einfachen Varianzanalyse (36), nicht signifikant verändert:

Befall des Dünndarms: $3469{,}20 \pm 1224{,}16$ (n = 25)
Befall des Dickdarms: $2776{,}36 \pm 670{,}86$ (n = 11)
Befall des Dünn- und Dickdarms: $3341{,}78 \pm 1508{,}54$ (n = 28)
Zustand nach Operation: $3963{,}91 \pm 2180{,}47$ (n = 23)

3. Vergleich der Meßergebnisse der Crohn-Patienten nach dem Aktivitätsindex

Nach dem Aktivitätsindex wurden die Patienten mit Morbus Crohn in drei Gruppen eingeteilt (siehe Abb. 4):

Aktivitätsindex ≤ 100: $3307{,}2 \pm 1252{,}34$ (n = 25)
Aktivitätsindex $101 \leq 200$: $3754 \pm 1795{,}58$ (n = 45)
Aktivitätsindex > 200: $3381{,}25 \pm 1477{,}4$ (n = 24)

Auch hier zeigte sich keine Signifikanz der Gruppen untereinander, ebenso konnte keine Korrelation zwischen dem Aktivitätsindex und dem ß-Glucuronidasespiegel nachgewiesen werden.

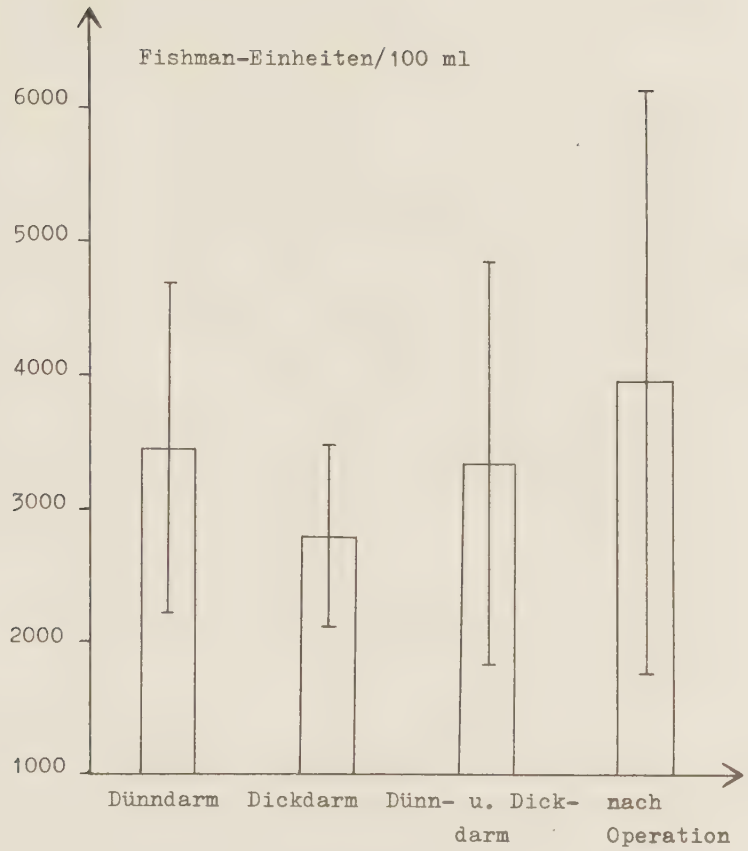

Abb. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen des ß-Glucuronidasegehaltes bei Crohn-Patienten, die nach unterschiedlichem Darmbefall und nach erfolgter Operation aufgeteilt wurden. Abszisse: Gruppeneinteilung

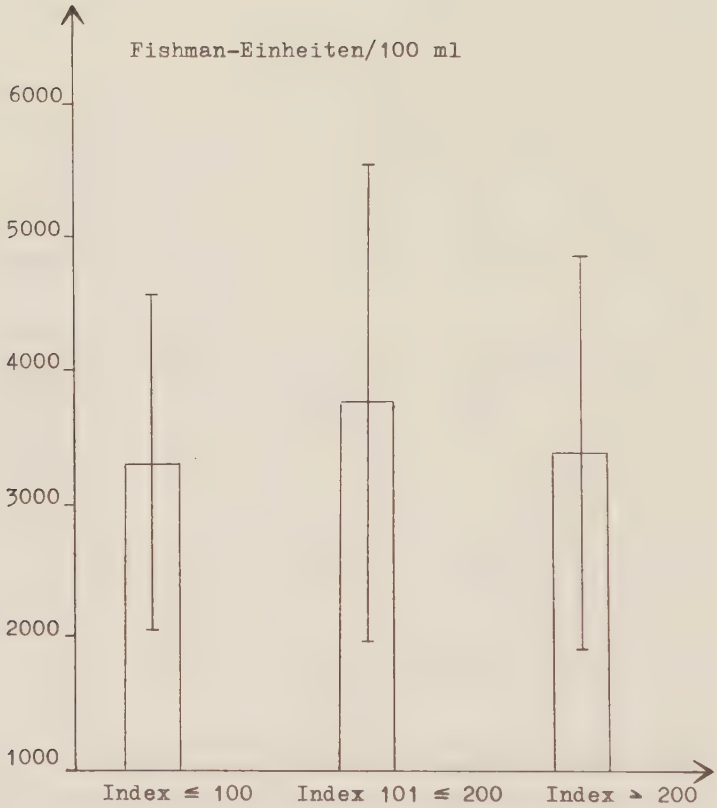

Abb. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen des ß-Glucuronidasegehaltes bei Crohn-Patienten, deren Krankheitsstadium mit Hilfe des Aktivitätsindex in drei Schweregrade eingeteilt wurde.
Abszisse: Gruppeneinteilung

II Hyaluronidase

1. Aufschlüsselung des Patienten- und Probandenkollektives

Bei 110 Patienten (60 Männer, 50 Frauen) und 14 Probanden (9 Männer, 5 Frauen) wurde die Hyaluronidasekonzentration in U/l im Serum bestimmt. Die Untersuchung ergab, daß 36 Patienten „positive" Ergebnisse (d.h. Hyaluronidaseaktivität $\succ 0$) und 74 Patienten „negative" Werte (d.h. Hyaluronidaseaktivität = 0) aufwiesen. Die 36 positiven Fälle teilten sich weiter auf in 27 Crohn-Kranke (17 Männer, 10 Frauen) und 9 Patienten mit Colitis ulcerosa (6 Frauen, 3 Männer). Die aus 74 Patienten bestehende Gruppe setzte sich zusammen aus: 59 Crohn-Kranken (35 Männer, 24 Frauen), 14 Colitis-Patienten (10 Frauen, 4 Männer) und einem Patienten (Mann) mit Sprue (siehe Abb. 5).

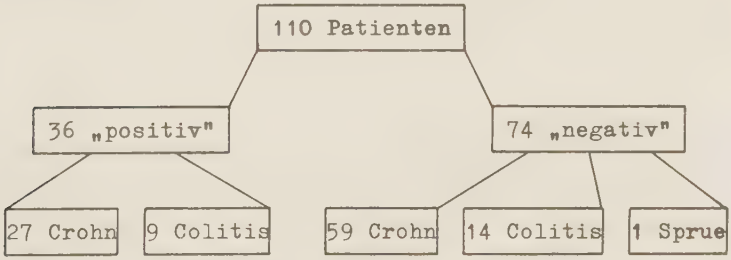

Abb. 5: Aufgliederung des Patientenkollektives, das zur Hyaluronidasebestimmung herangezogen wurde

Das Normalkollektiv (n = 14) ergab bei 8 Probanden (5 Männer, 3 Frauen) einen Hyaluronidasespiegel, der $\succ 0$ war, bei 6 Personen (4 Männer, 2 Frauen) war er = 0.

Aus statistischen Gründen wurden zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung bei der Kontrollgruppe nur die Werte mit einer Hyaluronidaseaktivität > 0 berücksichtigt.

2. Vergleich der Meßergebnisse zwischen Crohn-Patienten und Probanden

Die Mittelwerte der Hyaluronidasekonzentration in U/l mit ihren Standardabweichungen betrugen:

Probanden: $1{,}7 \pm 0{,}88$ (n = 8)
Patienten mit Morbus Crohn: $13{,}72 \pm 12{,}93$ (n = 27)
Patienten mit Colitis ulcerosa: $12{,}82 \pm 14{,}91$ (n = 9)

Nach dem t-Test (36,64) berechnet, zeigte sich eine statistische Signifikanz mit $p \leq 0{,}05$ der Crohn-Patienten gegenüber den gesunden Personen (siehe Abb. 6).

3. Vergleich der Meßergebnisse der Crohn-Patienten nach Ausdehnung der Erkrankung und nach erfolgter Operation

Der Versuch, das Krankengut mit Morbus Crohn nach der Ausdehnung der Erkrankung und nach der Operation miteinander zu vergleichen, erbrachte keine signifikanten Veränderungen durch die einfache Varianzanalyse (36). Die Hyaluronidaseaktivität mit Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der 4 Gruppen (siehe Abb. 7) ergab:

Befall des Dünndarms: $23{,}72 \pm 18{,}27$ (n = 8)

Befall des Dickdarms: $7{,}96 \pm 4{,}34$ (n = 4)
Befall des Dünn- und Dickdarms: $10{,}38 \pm 9{,}24$ (n = 8)
Zustand nach Operation: $10{,}08 \pm 5{,}66$ (n = 4)

4. Vergleich der Meßergebnisse des Crohn-Kollektives nach dem Aktivitätsindex

Patienten mit Morbus Crohn nach dem Aktivitätsindex aufgeschlüsselt, zeigten weder eine statistische Signifikanz innerhalb der drei Gruppen noch konnte eine Korrelation zwischen Aktivitätsindex und Hyaluronidasespiegel nachgewiesen werden (siehe Abb. 8):

Aktivitätsindex ≤ 100: $13{,}93 \pm 11{,}75$ (n = 4)
Aktivitätsindex $101 \leq 200$: $13{,}58 \pm 12{,}70$ (n = 16)
Aktivitätsindex > 200: $13{,}91 \pm 15{,}86$ (n = 7)

Abb. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen des Hyaluronidasegehaltes bei zwei Untersuchungsgruppen.
Abszisse: Gruppeneinteilung

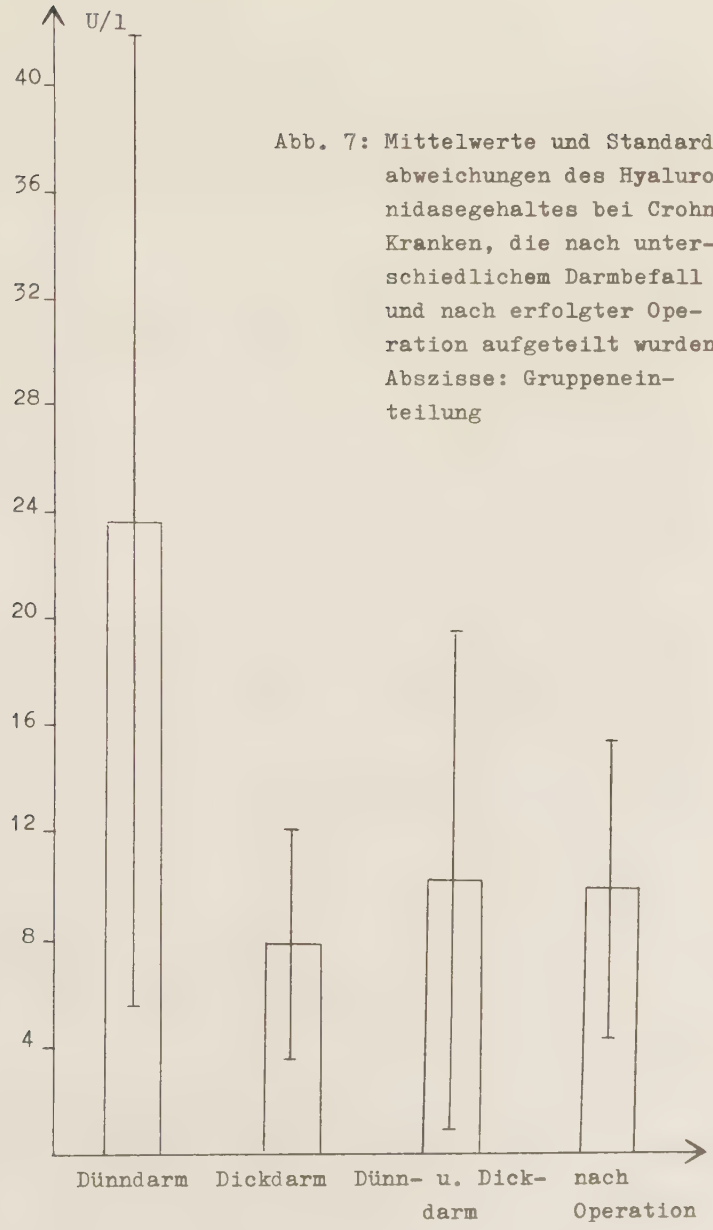

Abb. 7: Mittelwerte und Standardabweichungen des Hyaluronidasegehaltes bei Crohn-Kranken, die nach unterschiedlichem Darmbefall und nach erfolgter Operation aufgeteilt wurden. Abszisse: Gruppeneinteilung

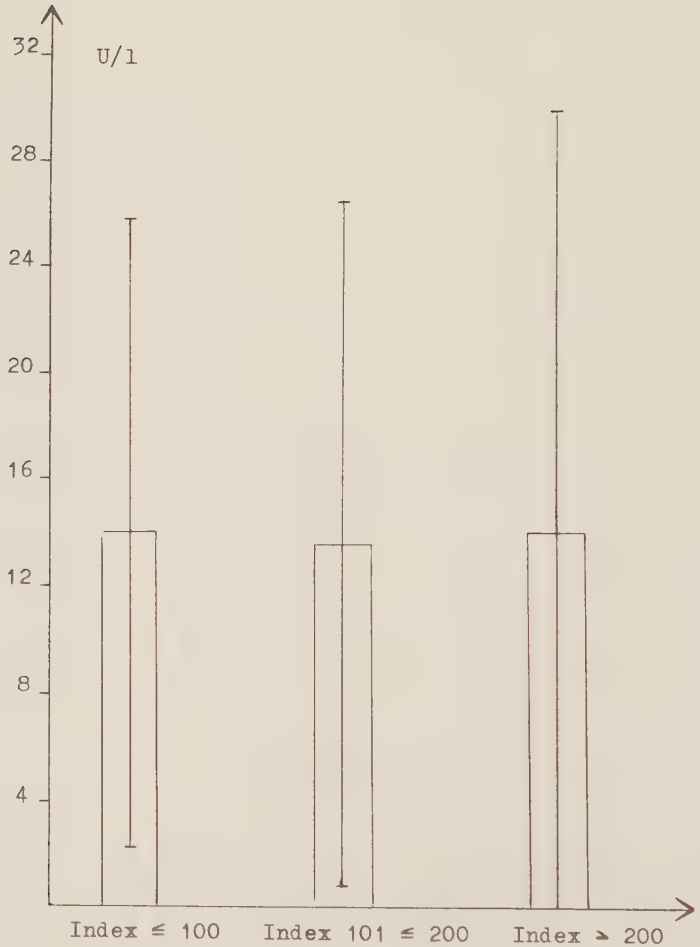

Abb. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen des Hyaluronidasegehaltes bei Crohn-Patienten, deren Krankheitsstadium mit Hilfe des Aktivitätsindex in drei Schweregrade eingeteilt wurde.
Abszisse: Gruppeneinteilung

E ZUSAMMENFASSUNG

(1) Bei 96 Patienten mit Morbus Crohn und 25 Patienten mit Colitis ulcerosa wurde Serum auf ß-Glucuronidase untersucht. Es wurden folgende Mittelwerte und Standardabweichungen in Fishman-Einheiten/100 ml bei 56° C ermittelt:

Probanden: $2620 \pm 637{,}47$ (n = 12)
Patienten mit Morbus Crohn: $3478{,}44 \pm 1625{,}53$ (n = 96)
Patienten mit Colitis ulc.: $3471{,}60 \pm 1507{,}15$ (n = 25)

Nach dem t-Test (36,64) berechnet, zeigte sich dabei eine statistische Signifikanz ($p \leq 0{,}05$) der beiden Patientenkollektive gegenüber den Probanden.

(2) Die Hyaluronidasekonzentration wurde bei insgesamt 110 Patienten bestimmt. Es ergaben sich dabei folgende Aufschlüsselungen: 36 Ergebnisse mit einer Hyaluronidaseaktivität > 0 und 74 Werte mit einer Hyaluronidaseaktivität = 0. Die 36 Fälle teilten sich weiter auf in 27 Crohn-Patienten und 9 Patienten mit Colitis ulcerosa. Sie wiesen nachfolgende Mittelwerte und Standardabweichungen in U/l auf:

Probanden: $1{,}7 \pm 0{,}88$ (n = 8)
Patienten mit Morbus Crohn: $13{,}72 \pm 12{,}93$ (n = 27)
Patienten mit Colitis ulc.: $12{,}82 \pm 14{,}91$ (n = 9)

Auch diese Ergebnisse waren nach dem t-Test (36,64) statistisch signifikant ($p \leq 0{,}05$).

(3) Weitere Berechnungen ergaben, daß für beide Enzyme keine Korrelation zwischen den jeweiligen Fermentspiegeln und dem entsprechenden Aktivitätsindex bestand. Auch konnten innerhalb der Gruppen, die nach Ausdehnung der Entzündung und nach erfolgter Operation aufgestellt worden waren, keine statistisch signifikanten Ergebnisse durch die einfache Varianzanalyse (36) errechnet werden.

(4) Die ß-Glucuronidase- und Hyaluronidasebestimmung im Serum eignet sich nach den vorliegenden Versuchsergebnissen weder zur Differentialdiagnose zwischen dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa noch zur Beurteilung der Krankheitsaktivität des Morbus Crohn. Die ß-Glucuronidasebestimmung läßt aber mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % die Aussage zu, daß bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa der Gehalt an ß-Glucuronidase gegenüber einem Kontrollkollektiv erhöht ist. Diese experimentelle Feststellung erlaubt daher die Verwendung des ß-Glucuronidasenachweises als Test zur laborchemischen Bestätigung einer Enteritis regionalis bzw. einer Colitis ulcerosa. Mit derselben Wahrscheinlichkeit von 95 % trifft diese Aussage auch für etwa 1/3 der Fälle bei dem Enzym Hyaluronidase zu. Bei 2/3 der Fälle war die Hyaluronidaseaktivität gleich Null, was gegen eine konstante Hyaluronidaseerhöhung bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa spricht. Folglich scheint diese Labormethode ungeeignet für den Krankheitsnachweis des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa, obwohl die Ursache für den relativ hohen Anteil an positiven Werten unklar ist.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Beaudin, D., L.R. Da Costa, R.S.A. Prentice and I.T. Beck
Crohn's disease of the stomach. A case report and review of the literature.
Amer. J. dig. Dis. 18, 623 - 629 (1973)

2. Berning, H., W. Selberg und K.O. Thiele
Die Ileitis regionalis.
Stuttgart: Enke 1964

3. Bicks, R.O., M.M. Azar, E.W. Rosenberg, W.G. Dunham and J. Luther
Delayed hypersensitivity reactions in the intestinal tract.
Gastroenterology 53, 422 - 436 (1967)

4. Bishop, R.P., A.C. Brewster and D.A. Antonioli
Crohn's disease of the mouth.
Gastroenterology 62, 302 - 306 (1972)

5. Cave, D.R., D.N. Mitchell, S.P. Kane and B.N. Brooke
Further animal evidence of a transmissible agent in Crohn's disease.
Lancet 1973 II, 1120 - 1122

6. Christopher, N.L., D.W. Watson and E.R. Farber
Relationship of chronic ulcerative esophagitis to ulcerative colitis.
Ann. intern. Med. 70, 971 - 976 (1969)

7. Crohn, B.B., L. Ginzburg and G.D. Oppenheimer
Regional ileitis. A pathologic and clinical entity.
J. Amer. med. Ass. 99, 1323 - 1329 (1932)

8. Doe, W.F., C.C. Booth and D.L. Brown
Evidence for complement-binding immune complexes in adult coeliac disease, Crohn's disease and ulcerative colitis.
Lancet 1973 I, 402 - 403

9. Dohrmann, R.E.
Die ß-Glucuronidaseaktivität im Serum bei einigen inneren Krankheiten.
Z. ges. exp. Med. 132, 585 - 593 (1960)

10. Dohrmann, R.E.
ß-Glucuronidase
In: Hegglin R., F. Leuthardt, R. Schoen, H. Schwiegk, A. Studer und H.U. Zollinger, Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik, Band 28, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1969

11. Dohrmann, R.E. und B. Louven
Das physiologische Verhalten der ß-Glucuronidase im weiblichen Organismus.
Arch. Gynäk. 205, 279 - 286 (1968)

12. Dudek, B., H.M. Spiro and W.R. Thayer jr.
A study of ulcerative colitis and circulating antibodies to milk proteins.
Gastroenterology 49, 544 - 547 (1965)

13. Dudeney, T.P.
Crohn's disease of the mouth.
Proc. roy. Soc. Med. 62, 1237 (1969)

14. Dunn, G.D., R.R. Laing and A.P. Klotz
Crohn's disease of the stomach.
Gastroenterology 56, 1229 (1969)

15. Edwards, F. and S.C. Truelove
The course and prognosis of ulcerative colitis.
Gut 5, 1 - 22 (1964)

16. Fahrländer, H. und F. Huber
Tierexperimentelle Untersuchungen über allergische Entzündungen im Dünndarm.
Gastroenterologia (Basel) 97, 156 - 187 (1962)

17. Fahrländer, H. und F. Huber
Tierexperimentelle Untersuchungen zur allergischen Spätreaktion im Dünndarm.
In: European Congress of Allergy, Kongreßbericht, pp 345 - 347, Basel: 1962

18. Fahrländer, H. und E. Shalev
Die Enterocolitis regionalis Crohn.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2207 - 2214 (1974)

19. Fahrländer, H. und E. Shalev
Colitis ulcerosa und Enterocolitis regionalis Crohn.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2235 - 2240 (1974)

20. Farmer, R.G., W.A. Hawk and R.B. Turnbull jr.
Clinical patterns in Crohn's disease. A statistical study of 615 cases.
Gastroenterology 68, 627 - 635 (1975)

21. Farmer, G.W., M.M. Vincent, D.A. Fuccillo, L. Horta-Barbosa, S. Ritman, J.L. Sever and G.L. Gitnick
Viral investigations in ulcerative colitis and regional enteritis.
Gastroenterology 65, 8 - 18 (1973)

22. Fishman, W.H. and A.J. Anlyan
The presence of high ß-glucuronidase activity in cancer tissue.
J. biol. Chem. 169, 449 - 450 (1947)

23. Fishman, W.H., G.S. Benjamin and S. Green
A biochemical effect of gonadotropin (ICSH): Renal ß-glucuronidase stimulation.
J. biol. Chem. 222, 351 - 361 (1956)

24. Fishman, W.H., K. Kato, C.L. Anstiss and S. Green
Human serum ß-glucuronidase; its measurement and some of its properties.
Clin. Chim. Acta 15, 435 - 447 (1967)

25. Gibian, H.
Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen.
Wien: Franz Deuticke 1959

26. Giorgini, G.L.
Etiology of inflammatory bowel disease.
In: Lukash W.M. and R.B. Johnson, The systemic manifestations of inflammatory bowel disease, pp 11 - 28,
Springfield, Illinois, USA: Thomas 1975

27. Hagenfeldt, L. and F. Wahlberg
Serum ß-glucuronidase, glucose tolerance and atherosclerotic disease.
Lancet 1965 I, 788 - 789

28. Heller, W.
Unveröffentlicht
Chirurgische Universitätsklinik Tübingen

29. Israel, H.L. and R.A. Goldstein
Relation of Kveim-antigen reaction to lymph-adenopathy. Study of sarcoidosis and other diseases.
New Engl. J. Med. 284, 345 - 349 (1971)

30. Jewell, D.P.
Etiology of ulcerative colitis.
Proc. roy. Soc. Med. 66, 1031 - 1032 (1973)

31. Jones, J.V.
Aetiology of regional enteritis.
Lancet 1968 I, 1252

32. Karlish, A.J., E.V. Cox, F. Hampson and E.H. Hemsted
The Kveim test in Crohn's disease, ulcerative colitis and coeliac disease.
Lancet 1972 II, 438 - 439

33. Kasper, H.
Klinik und Therapie der Enteritis regionalis (Morbus Crohn).
Dtsch. med. Wschr. 97, 844 - 849 (1972)

34. Kayahan, S.
Atherosclerosis and ß-glucuronidase.
Lancet 1960 II, 667 - 669

35. Keining, E. und O. Braun-Falco
Vergleichende Betrachtungen über das Keloid, Sklerödem und myxödematöse Hautveränderungen.
Derm. Wschr. 126, 633 - 640 (1952)

36. Kollegium Biomathematik NW
Biomathematik für Mediziner.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1975

37. Krauspe, C., K. Müller-Wieland und F. Stelzner
Colitis ulcerosa und granulomatosa.
München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1972

38. Linker, A.
Hyaluronidase.
In: Bergmeyer H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, pp 980 - 984,
3. Aufl., Weinheim, Bergstr.: Verlag Chemie 1974

39. LiVolsi, V.A. and A. Jaretzki
Granulomatous esophagitis.
Gastroenterology 64, 313 - 319 (1973)

40. Meyer, K., R. Dubos and E.M. Smyth
The hydrolysis of the polysaccharide acids of vitreous humor, of umbilical cord, and of streptococcus by the autolytic enzyme of pneumococcus.
J. biol. Chem. 118, 71 - 78 (1937)

41. Miller, B.F., F.P. Keyes and P.W. Curreri
Increase of serum ß-glucuronidase activity in human diabetes mellitus.
J. Amer. med. Ass. 195, 189 - 192 (1966)

42. Mitchell, D.N. and R.J.W. Rees
A transmissible agent from sarcoid tissue.
Lancet 1969 II, 81 - 84

43. Mitchell, D.N. and R.J.W. Rees
Agent transmissible from Crohn's disease tissue.
Lancet 1970 II, 168 - 171

44. Mitchell, D.N., P. Cannon, N.H. Dyer, K.F.W. Hinson and J.M.T. Willoughby
The Kveim test in Crohn's disease.
Lancet 1969 II, 571 - 573

45. Mitchell, D.N., P. Cannon, N.H. Dyer, K.F.W. Hinson and J.M.T. Willoughby
Further observations on Kveim test in Crohn's disease.
Lancet 1970 II, 496 - 498

46. Morson, B.C.
Pathologisch-anatomische Veränderungen des Dickdarmes und der Analregion bei Crohn'scher Erkrankung.
Z. Gastroent. 2, 255 - 268 (1964)

47. Morson, B.C.
Pathology of ulcerative colitis.
Zitiert nach Watkinson G. (65)

48. Naish, J.M., B.D. Batvharov and V.L. Lawoyin
A case of ulcerative colitis and pyostomatitis vegetans in an african.
Gut 11, 38 - 40 (1970)

49. National Cooperative Crohn's Disease Study
Persönliche Mitteilung von Privatdozent Dr. H. Malchow,
Medizinische Universitätsklinik Tübingen

50. Nilius, R.
Die Serum-ß-Glucuronidase bei Lebererkrankungen.
Med. Klin. 62, 1082 - 1086 (1967)

51. Perlmann, P. and O. Broberger
In vitro studies of ulcerative colitis.
II. Cytotoxic action of white blood cells from patients on human fetal colon cells.
J. exp. Med. 117, 717 - 733 (1963)

52. Platt, D. und M. Platt
Hyaluronidase-, ß-Glucuronidase- und ß-Acetylglucosaminidase-Aktivität im menschlichen Serum während der Schwangerschaft.
Klin. Wschr. 46, 768 - 771 (1968)

53. Rapoport, S.M.
Medizinische Biochemie.
5. Aufl., Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1969

54. Reifferscheid, M.
Chirurgie des Morbus Crohn.
Med. Klin. 70, 747 - 756 (1975)

55. Sera, Y.
Zur Kenntnis der gepaarten Glucuronsäuren. III. Mitteilung. Über die Spaltung der Orcin- und Phloroglucinglucuronsäure durch Organsäfte.
Z. physiol. Chem. 92, 261 - 275 (1915)

56. Shorter, R.G., K.A. Huizenga and R.J. Spencer
A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of non spezific inflammatory bowel disease.
Amer. J. dig. Dis. 17, 1024 - 1032 (1972)

57. Shorter, R.G., M. Cardoza, R.J. Spencer and K.A. Huizenga
Further studies of in vitro cytotoxicity of lymphocytes from patients with ulcerative and granulomatous colitis for allogeneic colonic epithelial cells, including the effects of colectomy.
Gastroenterology 56, 304 - 309 (1969)

58. Shorter, R.G., K.A. Huizenga, R.J. Spencer and S.K. Guy
Inflammatory bowel disease: the role of lymphotoxin in the cytotoxicity of lymphocytes for colonic epithelial cells.
Amer. J. dig. Dis. 17, 689 - 696 (1972)

59. Shorter, R.G., R.J. Spencer, K.A. Huizenga and G.A. Hallenbeck
Inhibition of in vitro cytotoxicity of lymphocytes from patients with ulcerative colitis for allogeneic colonic epithelial cells using horse anti-human thymus serum.
Gastroenterology 54, 227 - 231 (1968)

60. Siltzbach, L.E., L.O.B.D. Vieira, M. Topilsky and H.D. Janowitz
Is there Kveim responsiveness in Crohn's disease?
Lancet 1971 II, 634 - 636

61. Slaney, G.
Hypersensitivity, granulomata and the alimentary tract.
Ann. roy. Coll. Surg. Engl. 31, 249 - 267 (1962)

62. Turina, M., M. Schamann und W. Waldvogel
Crohnsche Krankheit des Oesophagus.
Dtsch. med. Wschr. 93, 2097 - 2099 (1968)

63. Vandenbroucke, J., G. Vantrappen, L. Rutgeerts und G. Tytgat
Morbus Crohn.
In: Demling L., Klinische Gastroenterologie, pp 386 - 398,
Band 1, Stuttgart: Thieme 1973

64. Walter, E.
Biomathematik für Mediziner.
Stuttgart: B.G. Teubner 1975

65. Watkinson, G.
Colitis ulcerosa.
In: Demling L., Klinische Gastroenterologie, pp 399 - 418,
Band 1, Stuttgart: Thieme 1973

66. Weterman, I.T., A.S. Pena and C.C. Booth
The management of Crohn's disease.
Amsterdam, Oxford: Excerpta Medica 1976

Herrn Professor Dr. med. J. Durst möchte ich besonders danken für die Stellung des Dissertationsthemas und die jederzeit freundliche Unterstützung bei den während der Arbeit sich ergebenden Problemen.

Herrn Professor Dr. rer. nat. W. Heller danke ich für die Einräumung eines Arbeitsplatzes im Labor der Chirurgischen Klinik sowie für seinen Rat bezüglich der Laborarbeit.

Herrn G. Deichsel vom Biomathematischen Institut sei gedankt für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Herrn Privatdozent Dr. med. H. Malchow gilt mein Dank für die Überlassung der Patientenseren.

L e b e n s l a u f

Am 4. November 1950 wurde ich, Roswitha Maria Stöckeler, als Tochter des Masseurs Johann Stöckeler und seiner Ehefrau Berta, geb. Heim, in Haslach/Oberallgäu geboren.

Von 1957 - 1962 besuchte ich die Grundschule in Oy, von 1962 - 1971 das Städt. Neusprachliche und Sozialwissenschaftliche Gymnasium für Mädchen in Kempten, an dem ich am 19. Juni1971 die ordentliche Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1971 begann ich das Biologie- und Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Zum Sommersemester 1973 nahm ich an der Universität Tübingen das Medizinstudium auf. Vor dem Landesprüfungsamt Baden-Württemberg für Medizin und Pharmazie legte ich 1975 die ärztliche Vorprüfung und 1976 den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Reutlingen ab, sowie den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1978 in Tübingen. Vom 17. April 1978 bis 24. März 1979 nahm ich an den Städt. Krankenanstalten Esslingen und am Paracelsus-Krankenhaus Ruit a. F., beide Akademische Lehrkrankenhäuser der Universität Tübingen, am klinisch-praktischen Unterricht in den Fächern Chirurgie, Innere Medizin und Anästhesiologie teil.

Am 30. April 1979 beendete ich mein Medizinstudium mit dem 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.